درسنامه دوره

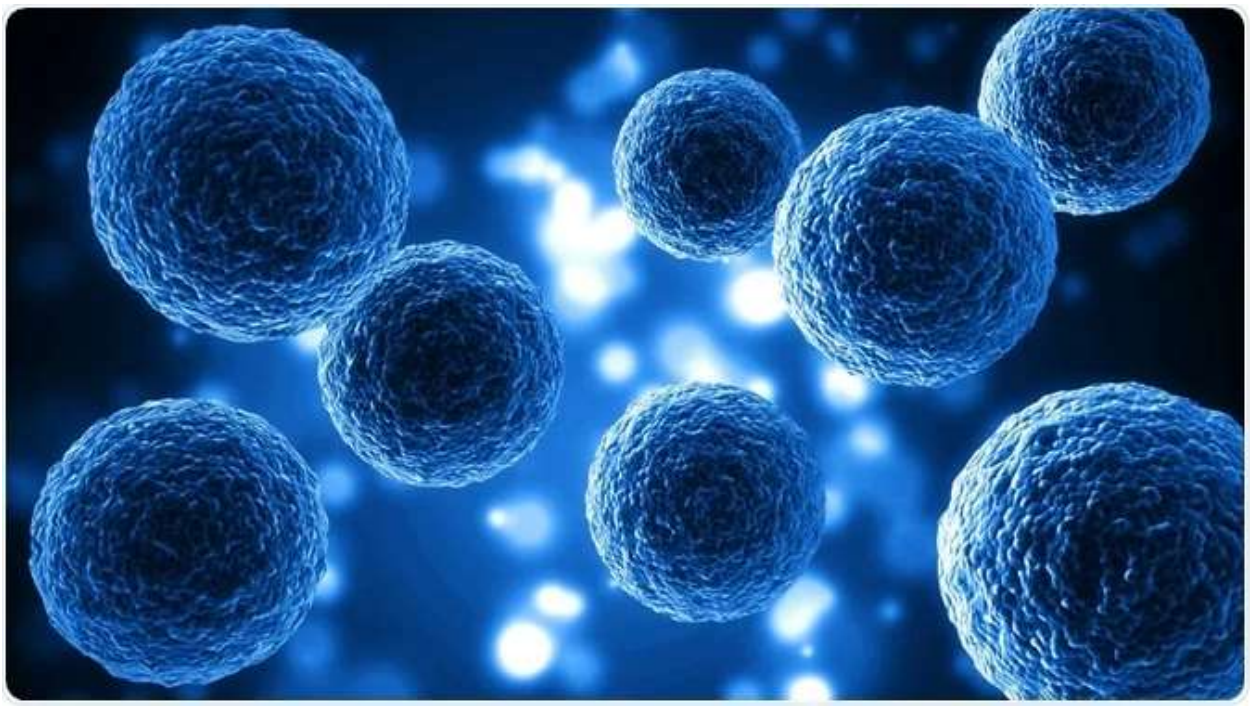
کارآموزی بیوانفورماتیک

(پیش نیاز دوره ی آموزشی)

مقدمه

برای ورود به دنیای عظیم و زیبای بیوانفورماتیک در ابتدا بایستی اطلاعات پایه ی ژنتیکی مانند ساختار DNA، RNA و پروتئین ها را بشناسید تا بتوانید از اطلاعات موجود در پایگاه های داده ی بیوانفورماتیکی به نحو احسن استفاده نمایید. همچنین بایستی با اصول central dogma که شامل فرآیندهای همانندسازی، رونویسی و ترجمه می شود آشنایی کامل داشته باشید. با مفاهیمی مانند ژن، ژنوم، ترنسکریپتوم، پروتئوم و متابولوم آشنایی داشته باشید تا بتوانید از این مفاهیم و داده های موجود در پایگاه داده های مرتبط با ژنوم، ترنسکریپتوم، پروتئوم و متابولوم در جهت آنالیز داده ها، مسیرهای بیولوژیکی و شبکه های زیستی مورد نظر خود استفاده نمایید.

همانطور که می دانید سلول به کوچکترین واحد زیستی در موجودات زنده اطلاق می شود. تمامی سلول ها از اندامک های متفاوتی مانند هسته، شبکه آندوپلاسمی زبر و صاف، میتوکندری، اسکلت سلولی و غیره تشکیل شده است. دنیای داخل هسته، همان دنیایی است که مورد توجه محققان علم ژنتیک مولکولی و بیوانفورماتیک قرار گرفته است. در علم بیوانفورماتیک، در گام اول روابط بین مولکول های زیستی DNA و RNA و محصولات آن ها در سطح پروتئین و پپتید و در نهایت متابولیت و ترکیبات نهایی (compound) مورد بررسی قرار می گیرد.



اطلاعات ژنتیک ذخیره شده در کد های DNA که مولکول زیستی بسیار پایدار از نظر شیمیایی هستند، با دقت بالا کپی شده و به سلول های دختری منتقل می شوند. نواحی از مولکول DNA که وظیفه ساخت یک مولکول RNA را برعهده دارند ژن می نامند. ژنوم یوکاریوت ها از دو بخش تشکیل شده است که یک بخش مربوط به ژنوم هسته ای و یک بخش مربوط به ژنوم میتوکدریایی می باشد. تعداد ژن های DNA هسته ای بیشتر بوده و چند ده هزار ژن به علاوه ی نواحی تکراری می باشد. این در حالیست که DNA میتوکندریایی از ژن های اندک تشکیل شده اند. DNA دو رشته از طریق فرایند رونویسی، تبدیل به RNA تک رشته ای می شود و این mRNA به ریبوزوم ها منتقل شده و به شکل گروه هایی از سه نوکلئوتید یا کدون رمزگشایی می شوند و ساختار خطی آمینواسیدی تشکیل دهنده پلی پپتید ها را می سازند.

دو ماکرومولکول DNA و RNA ساختارهایی بسیار مشابه دارند. هر دو از مونومرهای نوکلئوتید تشکیل شده اند که از گنار هم قرار گیری این مونومرها، پلی مرهای DNA و RNA ساخته می شوند. دو ماکرومولکول DNA و RNA یکسری تفاوت هایی دارند که در زیر به این تفاوت ها اشاره می شود:

DNA دورشته ای است در حالیکه RNA تک رشته است.

RNA یا ریبونوکلئیک اسید دارای قند ۵ کربنه ریبوز بوده، در حالی که DNA یا دئوکسی ریبونوکلئیک اسید از قند ۵ کربنه دئوکسی ریبوز ایجاد شده است که در آن گروه هیدروکسیل OH– کربن شماره ۲ حذف شده است.

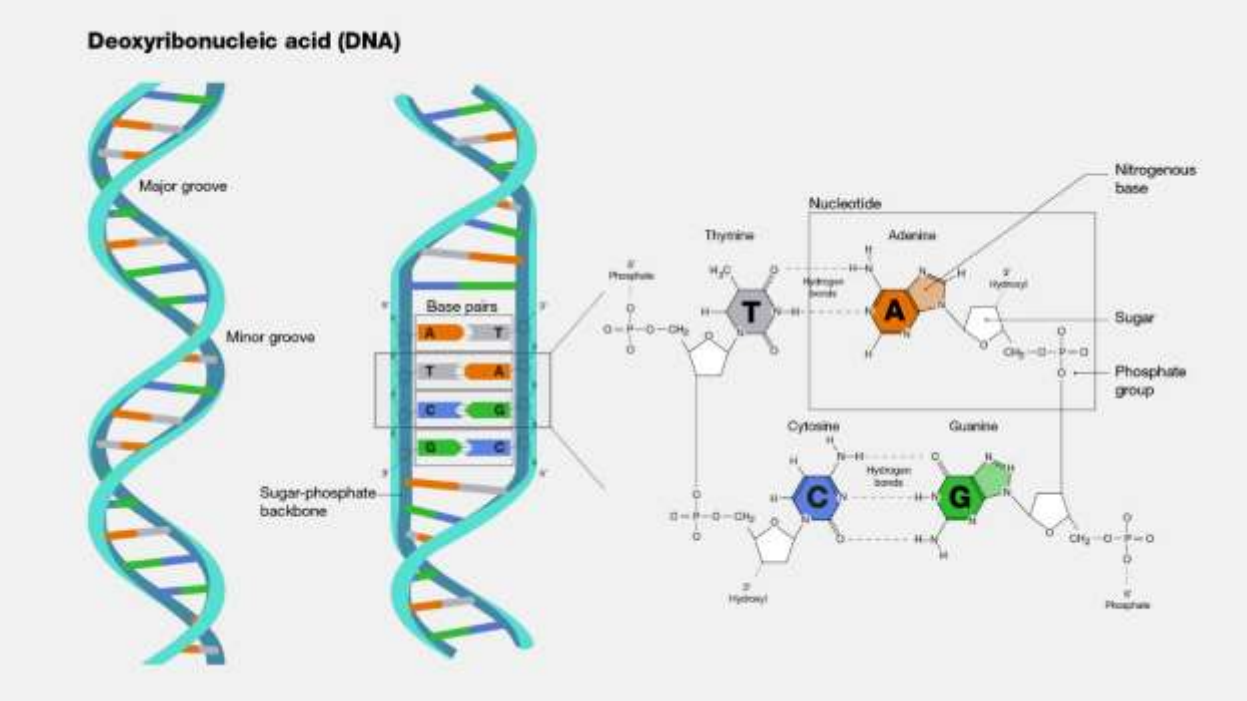
DNA دارای چهار باز آلی آدنین (A)، تیمین (T)، سیتوزین (C) و گوانین (G) می باشد، در حالی که ماکرومولکول RNA به جای باز آلی تیمین، باز آلی یوراسیل (U) را دارا می باشد.

ساختار نوکلئوتید:

هر نوکلئوتید در حالت آزاد و منفرد دارای یک قند ۵ کربنه ریبوز یا دئوکسی ریبوز، یک باز آلی متصل به کربن یک پریم و سه گروه فسفات متصل به کربن ۵ پریم است.

باز های آلی از حلقه های هتروسیکلیک اتم های کربن و نیتروژن تشکیل شده اند. به طور کلی، باز های آلی به دو دسته بازهای آلی تک حلقه ای یا پیریمیدین ها و بازهای آلی دو حلقه ای یا پورین ها تقسیم می شوند. بازهای تک حلقه ای یا پیریمیدین شامل بازهای تیمین (T)، سیتوزین (C) و یوراسیل (U) می باشد و بازهای آلی دو حلقه ای یا پورین ها شامل بازهای آدنین (A) و گوانین (G) می باشد.

زمانی که باز آلی به کربن یک پریم از قند پنج کربنه متصل می شود، به ساختار تشکیل شده نوکلئوزید گفته می شود. در مرحله ی بعدی سه گروه فسفات به کربن ۵ پریم قند اتصال می یابند که به این ساختار نوکلئوتید می گویند. نوکلئوتید های سازنده DNA دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTP) و نوکلئوتید های سازنده رشته RNA نوکلئوزید تری فسفات (NTP) می باشند. نوکلئوتیدها زمانی که در رشته DNA یا RNA به عنوان واحد سازنده وارد می شوند دو فسفات انتهایی خود را از دست داده و به شکل مونو فسفاته تبدیل می شوند.



با علم به اینکه مولکول های باردار در آب بسیار محلول می باشند مولکول های زیستی RNA و DNA نیز به دلیل داشتن گروه های فسفات پلی آنیون هایی با بار منفی محسوب شده و در آب حل می شوند. RNA و DNA

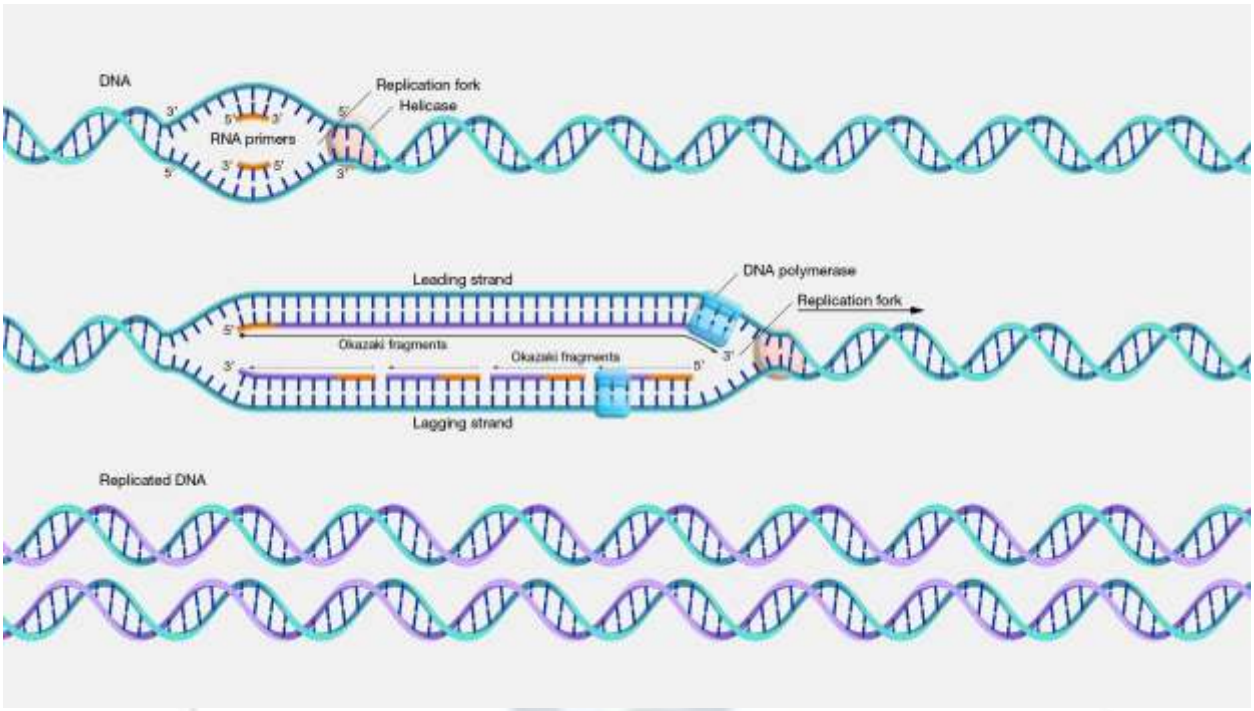
ساختمانی نردبانی شکل دارند به این ترتیب که اسکلت این نردبان را واحدهای قند و فسفات به طور یک در میان با پیوندهای فسفودی استری ۳ پریم و ۵ پریم تشکیل داده و پله های آن را جفت بازهای آلی که از طریق پیوند هیدروژنی به هم متصل شده اند تشکیل می دهند. جفت باز ها بر اساس قوانین واتسون و کریک به هم اتصال می یابند بنابراین در مقابل هر باز پورین یک باز پیریمیدین قرار می گیرد. باز آلی A روبروی باز آلی T و باز آلی C در مقابل باز آلی G قرار می گیرد.

جفت بازهای CG از طریق سه پیوند هیدروژنی و جفت باز های AT از طریق دو پیوند هیدروژنی کنار هم قرار می گیرند. با این شرایط تعداد بازهای آلی T با تعداد بازهای آلی A و تعداد بازهای آلی C با تعداد بازهای آلی G برابر می شود. بنابراین می توان ترکیب باز های DNA را با ذکر درصد GC در ترکیب آن مشخص نمود.

ساختمان نردبانی شکل DNA حول یک محور فرضی چرخیده و ساختار مارپیچ شکل به خود می گیرد. این چرخش به همراه تابیدگی ملایم، دو شیار کوچک و بزرگ را در DNA تشکیل می دهد. به دلیل آنکه پیوند های فسفودی استری بین کربن ۳ پریم از یک نوکلئوتید با فسفات کربن ۵ پریم از نوکلئوتید مجاور تشکیل می شوند دو انتهای یک رشته DNA خطی با هم تفاوت دارند.

به این نحو که در یک انتها فسفات متصل به کربن ۵ پریم آزاد بوده و در اتصال با نوکلئوتید دیگری قرار ندارد. از طرف دیگر درانتهای ۳ پریم نوکلئوتید دارای یک گروه ۳ پریم OH آزاد خواهد بود که در تشکیل پیوند شرکت نکرده است. براساس قوانین واتسون و کریک دو رشته DNA قرار گرفته روبروی هم نسبت به هم جهت عکس دارند و به فرم موازی ناهم سو هستند. دو رشته یک مولکول DNA دارای توالی های مکمل بوده به گونه ای که با دانستن توالی های بازی یک رشته می توان به آسانی توالی رشته مکمل را حدس زد. به طور معمول DNA را با نوشتن توالی بازی تنها یکی از رشته ها در جهت ۵ به ۳ که جهت سنتز RNA و یا DNA جدید از روی الگوی DNA می باشد توصیف می کنند.

همانندسازی:

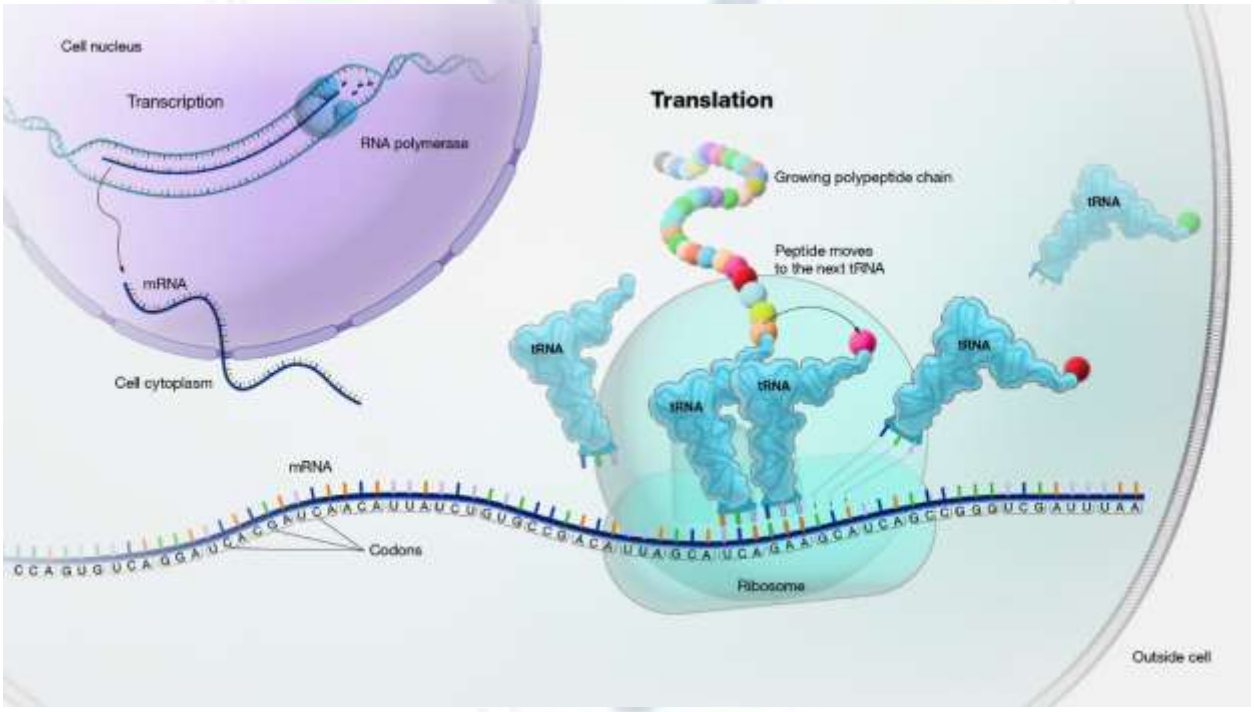


همانندسازی فرآیندی است که از طریق آن یک مولکول دو رشته ای DNA مضاعف شده و از آن دو مولکول DNA دو رشته ای حاصل می شود. دانستن کامل همانندسازی و شیوه انجام آن در بدن به فهم دیگر روش های تکثیری DNA در محیط آزمایشگاه همچون PCR و همچنین روش های طراحی پرایمر کمک شایانی خواهد کرد.

به منظور ساخت DNA جدید، در ابتدا بایستی مبداهای همانندسازی خاصی را شناسایی نمود. در مرحله بعد پیوندهای هیدروژنی دو رشته DNA از هم جدا می شود که این عمل توسط آنزیم هلیکاز صورت می گیرد. در مرحله بعد هر کدام از دو رشته به عنوان الگو برای ساخت رشته جدید قرار خواهد گرفت. به این حالت از همانند سازی، همانندسازی نیمه حفاظتی گفته می شود. برای ساخت رشته ی جدید نیازمند چهار داکسی نوکلئوزید تری فسفات (dTTP، dGTP، dCTP و dATP) هستیم. همانطور که می دانید آنزیم DNA polymerase که عمل همانندسازی را برای ما انجام می دهد، برای فعالیت نیاز به انتهای ۳ پریم OH آزاد می باشد که این سر ۳ پریم OH آزاد توسط یک قطعه کوتاه الیگونوکلئوتیدی با نام آغازگر یا پرایمر ایجاد می شود. پرایمر از جنس RNA به وسیله آنزیم پرایماز ساخته می شود. رشته DNA در جهت ۳ به ۵ رشته رهبر یا leading و رشته

مقابل در جهت ۵ به ۳ رشته پیرو یا lagging است. جهت همانندسازی و سنتز رشته جدید همیشه از ۵ پریم به ۳ پریم است. بنابراین جهت سنتز رشته رهبر در جهت حرکت چنگال همانندسازی است، در حالیکه رشته پیرو در خلاف حرکت آنزیم پلیمراز قرار دارد. بنابراین منقطع و ناپیوسته ساخته می شود. قطعات حاصل از همانندسازی رشته پیرو در نهایت بعد از حذف پرایمرهای RNA از ابتدای DNA های تازه سنتز شده به وسیله آنزیم لیگاز به یک دیگر متصل می شوند. از این رو همانندسازی را یک فرایند نیمه منقطع یا semi-discontinuous می نامند.

رونویسی:



طبق اصل central dogma از دو رشته ای DNA یک تک رشته RNA ایجاد می شود، که به این عمل رونویسی یا transcription گفته می شود. هر دو رشته تشکیل دهنده DNA می توانند به عنوان الگو برای ساخت RNA قرار بگیرند که به رشته الگو، Template یا آنتی سنس (antisense) و به رشته غیر الگو، nontemplate یا سنس (sense) می گویند. برای انجام رونویسی نیاز به توالی های تنظیمی مهمی در بالادست ژن هستیم که

این توالی ها تحت عنوان پروموتر (promoter) شناخته می شوند. بر روی پروموتر نواحی با نام cis-element ها وجود دارد که محل شناسایی فاکتورهای رونویسی بوده که هدایت و فعالسازی آنزیم RNApolymerase را برعهده دارند. موجودات یوکاریوتی دارای سه گروه RNA polymerase هستند.

RNApol I که کدکننده RNA های ریبوزومی srRNA28، srRNA 18 و srRNA 5.8 می باشد.

RNApol II که کد کننده ژن های miRNA، mRNA، snRNA ها و snoRNA می باشد.

RNApol III کد کننده srRNA، tRNA، snRNA و دیگر انواع RNA های کوچک غیر کد کننده می باشد.

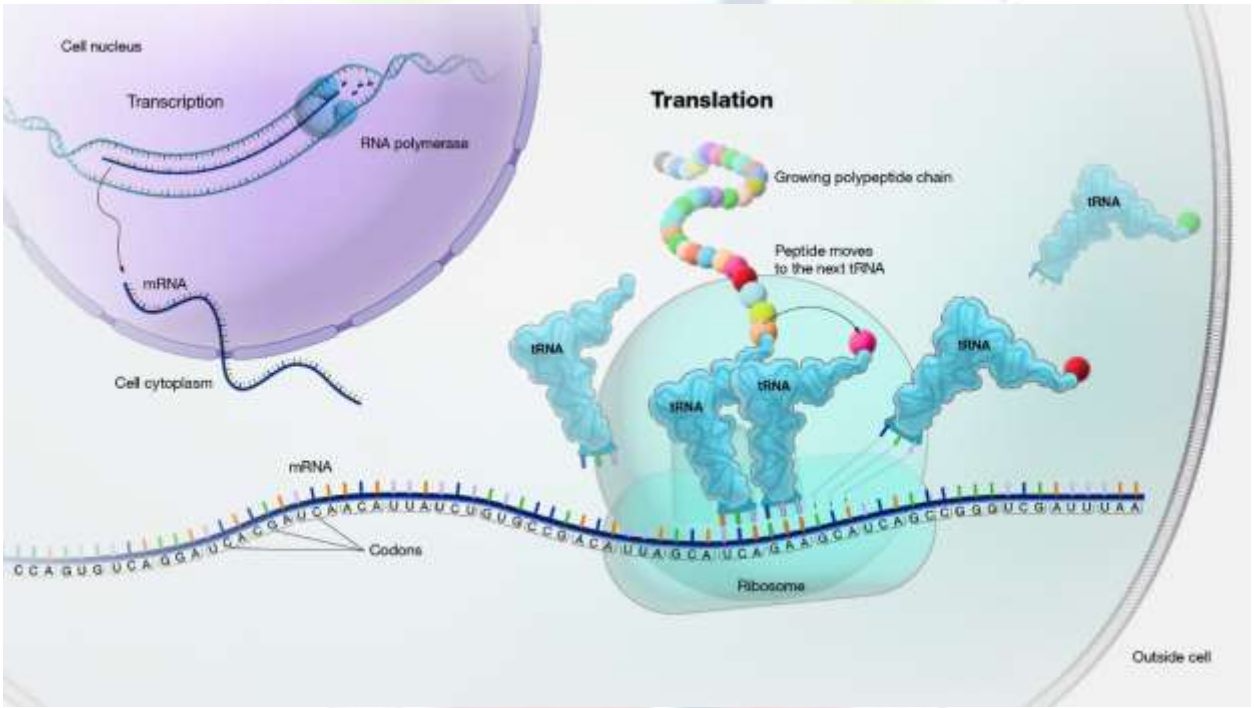
پیرایش و پردازش RNA:

اولین رونوشت RNA که در نتیجه ی رونویسی یا transcription ساخته می شود نابالغ بوده و برای بلوغ بایستی تحت فرآیندهای پردازش یا end modification و پیرایش یا splicing قرار می گیرد. در فرآیند end modification، یک نوکلئوتید گوانین متیله به جای پیوند معمول 3 OH به 5P از طریق پیوند غیر طبیعی 5P به 5P به نوکلئوتید اول از سر ۵ پریم اتصال می یابد که به این فرآیند کلاهک گذاری گفته می شود. از جمله مهمترین نقش های این کلاهک می توان به محافظت انتهای ۵ پریم در برابر حمله نوکلئازها، تسهیل پیرایش RNA و تسهیل انتقال mRNA از هسته به سیتوپلاسم اشاره نمود. طی فرایند پلی آدنیلاسیون حدودا ۲۰۰ نوکلئوتید آدنین (AMP) به ۳ اضافه شده و دم پلی A تشکیل می دهد. این دنباله پلی آدنینی در انتقال mRNA به سیتوپلاسم و پایداری آن همینطور شناسایی mRNA توسط ماشین پروتئین سازی (ریبوزوم) کمک می کند.

mRNA های بعد از فرآیند end modification بایستی در معرض پیرایش یا splicing قرار گیرند. در فرآیند پیرایش یا splicing اینترون ها حذف و اگزون ها به هم متصل می شوند. اگزون ها دارای کدون های رمز کننده پروتئین هستند در حالی که هیچ رمز ژنتیکی کدکننده محصول نهایی در اینترون ها وجود ندارد. اسپلایسینگ با شناسایی نواحی مرزی بین اگزون ها و اینترون ها اغاز می شود به نحوی که هر اینترون با یک دی نوکلئوتید GT

اغاز شده و به یک دی نوکلئوتید AG ختم می شود. قانون(GT-AG) این نواحی splice site نامیده می شوند. اپلایس سایت ها به شدت حفاظت شده هستند. علاوه بر نواحی GT-AG راهنماهای دیگری نیز در اینترون وجود دارند تا به وسیله آنها فاکتورهای اسپلایسینگ در برش اینترون ها و اتصال صحیح اگزون ها دچار خطا نشوند. یکی دیگر از این توالی های راهنما تحت عنوان ناحیه انشعاب یا Branch site در فاصله حدودا ۴۰ نوکلئوتیدی بالادست ناحیه AG واقع می باشد.

ترجمه:



در طول ترجمه که دومین مرحله اصلی در بیان ژن است، mRNA براساس کد ژنتیکی خوانده می شود که توالی DNA را به توالی اسید آمینه در پروتئین ها مرتبط می کند. هر گروه از سه باز در mRNA یک کدون را تشکیل می دهد و هر کدون یک اسید آمینه خاص را مشخص می کند. بنابراین، توالی mRNA به عنوان الگویی برای جمع آوری زنجیره اسیدهای آمینه که پروتئین را تشکیل می دهند، به ترتیب استفاده می شود.

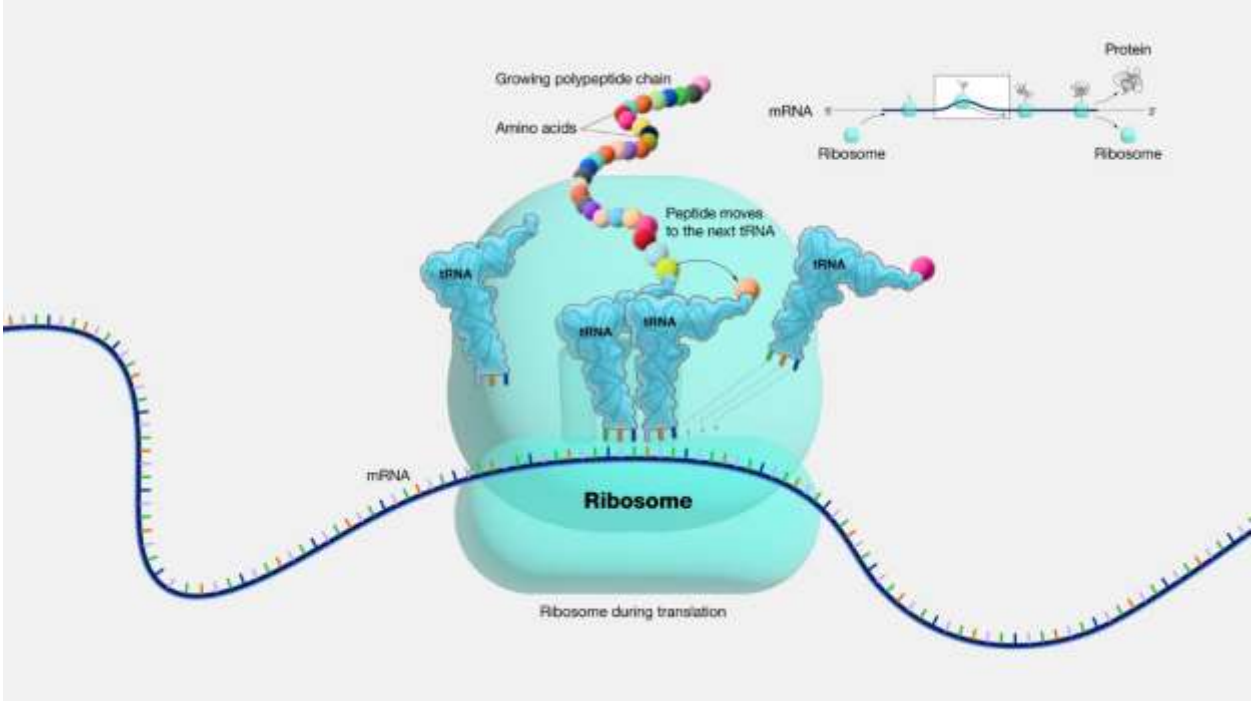
اما در کجای یک سلول ترجمه انجام می شود؟ چه مراحل فرعی جزئی از این فرآیند هستند؟ و آیا ترجمه بین پروکاریوت ها و یوکاریوت ها تفاوت دارد؟ پاسخ به سؤالاتی از این قبیل، شباهت های اساسی بین همه گونه ها را آشکار می کند.

جایی که ترجمه اتفاق می افتد

در درون همه سلول ها، ماشین ترجمه درون یک اندامک تخصصی به نام ریبوزوم قرار دارد. در یوکاریوت ها، مولکول های mRNA بالغ باید هسته را ترک کرده و به سیتوپلاسم، جایی که ریبوزوم ها قرار دارند، بروند. از سوی دیگر، در موجودات پروکاریوتی، ریبوزوم ها می توانند به mRNA متصل شوند، در حالی که هنوز رونویسی می شود. در این وضعیت، ترجمه از انتهای ۵ پریم mRNA آغاز می شود، در حالی که انتهای ۳ پریم هنوز به DNA متصل است.

در همه انواع سلول ها، ریبوزوم از دو زیر واحد تشکیل شده است: زیر واحد بزرگ یا 50 S و زیر واحد کوچک یا 30S. هر زیر واحد به طور جداگانه در سیتوپلاسم وجود دارد، اما این دو در مولکول mRNA به هم می پیوندند. زیر واحدهای ریبوزومی حاوی پروتئین ها و مولکول های تخصصی RNA هستند، به ویژه RNA ریبوزومی یا rRNA و RNA انتقالی یا tRNA. مولکول‌های tRNA مولکول‌های آداپتور هستند. آنها یک سر دارند که می‌تواند کد سه‌گانه mRNA را از طریق جفت‌سازی باز مکمل بخواند و یک سر دیگر که به یک اسید آمینه خاص متصل می‌شود. این ایده که tRNA یک مولکول آداپتور است برای اولین بار توسط فرانسیس کریک، یکی از کاشفان ساختار DNA، که بسیاری از کارهای کلیدی را در رمزگشایی کد ژنتیکی انجام داد، ارائه شد.

در داخل ریبوزوم، کمپلکس‌های mRNA و aminoacyl-tRNA در کنار هم قرار دارند که جفت شدن بازها را تسهیل می‌کند. rRNA اتصال هر اسید آمینه جدید به زنجیره در حال رشد را کاتالیز می کند.



جالب اینجاست که همه نواحی یک مولکول mRNA با اسیدهای آمینه خاصی مطابقت ندارند. به ویژه، ناحیه ای در نزدیکی انتهای ۵ پریم مولکول وجود دارد که به عنوان منطقه ترجمه نشده یا UTR یا دنباله رهبر شناخته می شود. این بخش از mRNA بین اولین نوکلئوتید که رونویسی می شود و کدون شروع یا AUG ناحیه کد کننده قرار دارد و روی توالی اسیدهای آمینه در پروتئین تأثیری ندارد. بنابراین هدف UTR چیست؟ معلوم شد که توالی رهبر مهم است زیرا حاوی یک محل اتصال به ریبوزوم است. در باکتری ها، این مکان به نام جعبه شین-دالگارنو (AGGAGG) به نام دانشمندان جان شاین و لین دالگارنو که اولین بار آن را مشخص کردند، شناخته می شود. سایت مشابهی در مهره داران توسط مرلین کوزاک مشخص شد و بنابراین به عنوان جعبه کوزاک شناخته می شود. در mRNA باکتریایی، 5’ UTR معمولا کوتاه است. در mRNA انسان، طول متوسط 5’ UTR حدود ۱۷۰ نوکلئوتید است. اگر رهبر طولانی باشد، ممکن است حاوی توالی های تنظیمی از جمله محل های اتصال پروتئین ها باشد که می تواند بر پایداری mRNA یا کارایی ترجمه آن تأثیر بگذارد.

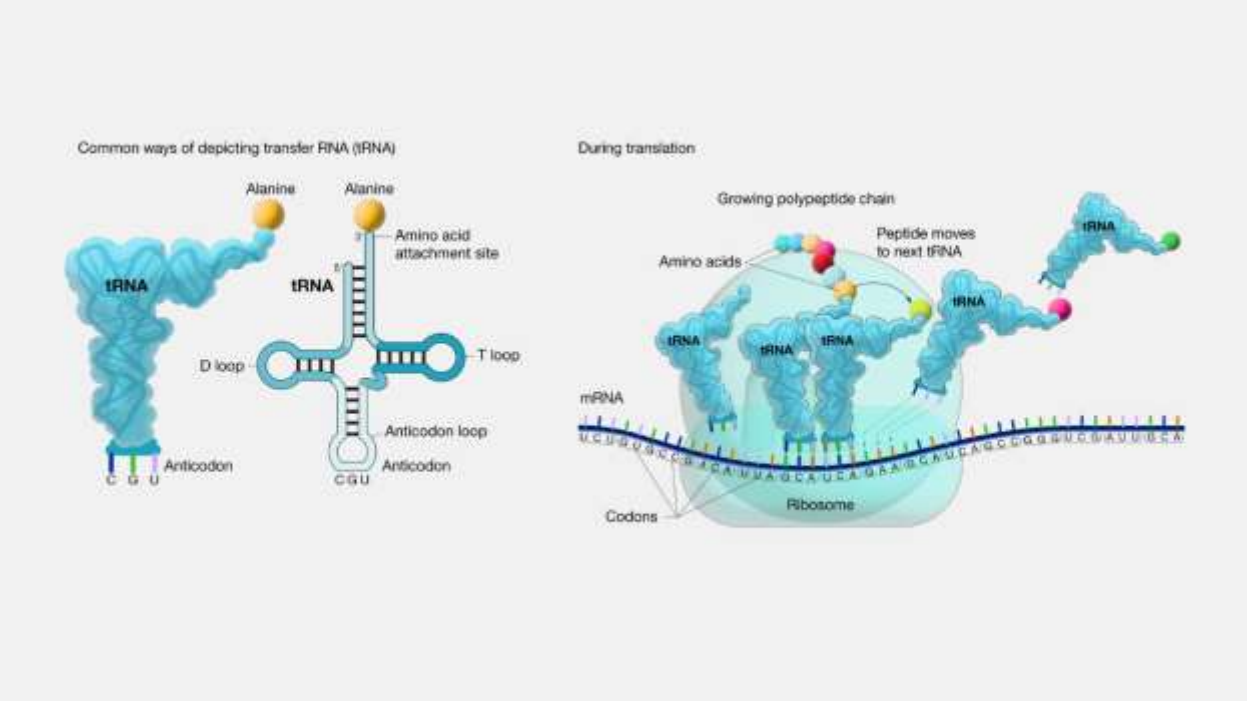
ترجمه پس از مونتاژ یک ساختار پیچیده آغاز می شود

ترجمه mRNA با تشکیل کمپلکس روی mRNA آغاز می شود. ابتدا، سه پروتئین فاکتور آغازی (IF1، IF2 و IF3) به زیر واحد کوچک ریبوزوم متصل می شوند. این کمپلکس پیش‌آغاز و tRNA حامل متیونین سپس به mRNA نزدیک کدون شروع AUG متصل می‌شوند و کمپلکس آغازین را تشکیل می‌دهند.

اگرچه متیونین (Met) اولین آمینو اسیدی است که در هر پروتئین جدید گنجانده شده است، اما همیشه اولین اسید آمینه در پروتئین های بالغ نیست. در بسیاری از پروتئین ها، متیونین پس از ترجمه حذف می شود. در واقع، اگر تعداد زیادی از پروتئین ها توالی یابی شوند و با توالی های ژنی شناخته شده آنها مقایسه شوند، متیونین یا فرمیل متیونین در انتهای N همه آنها ایجاد می شود. با این حال، همه اسیدهای آمینه به یک اندازه در زنجیره دوم قرار ندارند و اسید آمینه دوم بر حذف آنزیمی متیونین اولیه تأثیر می گذارد. به عنوان مثال، بسیاری از پروتئین ها با متیونین و سپس آلانین شروع می شوند. در هر دو پروکاریوت و یوکاریوت، این پروتئین ها متیونین را حذف می کنند، به طوری که آلانین به اسید آمینه N ترمینال تبدیل می شود. با این حال، اگر اسید آمینه دوم لیزین باشد، که اغلب این مورد نیز وجود دارد، متیونین حذف نمی‌شود (حداقل در پروتئین‌های نمونه‌ای که تاکنون مطالعه شده‌اند). بنابراین این پروتئین ها با متیونین و سپس لیزین شروع می شوند.

هنگامی که کمپلکس شروع روی mRNA تشکیل می شود، زیر واحد ریبوزومی بزرگ به این کمپلکس متصل می شود که باعث آزاد شدن Ifs یا عوامل آغازین می شود. زیرواحد بزرگ ریبوزوم دارای سه جایگاه است که مولکول‌های tRNA می‌توانند در آن‌ها متصل شوند. محل A (اسید آمینه) مکانی است که در آن باز آنتی کدون aminoacyl-tRNA با کدون mRNA جفت می شود و اطمینان حاصل می کند که اسید آمینه صحیح به زنجیره پلی پپتیدی در حال رشد اضافه می شود. مکان P (پلی پپتیدی) مکانی است که در آن اسید آمینه tRNA خود به زنجیره پلی پپتیدی در حال رشد منتقل می شود. در نهایت، محل E (خروج) مکانی است کهtRNA خالی قبل از آزاد شدن دوباره به سیتوپلاسم برای اتصال یک اسید آمینه دیگر و تکرار فرآیند در آن قرار می گیرد. آغازگر متیونین tRNA تنها آمینواسیل tRNA– است که می تواند در محل P ریبوزوم متصل شود و محل A با

کدون mRNA دوم هم تراز است. بنابراین ریبوزوم آماده اتصال دومین aminoacyl-tRNA در محل A است که با اولین پیوند پپتیدی به متیونین آغازگر متصل می شود.



فاز elongation

فاز بعدی در ترجمه به عنوان فاز elongation شناخته می شود. ابتدا ریبوزوم در امتداد mRNA در جهت ۵ به ۳ حرکت می کند که در فرایندی به نام جابجایی، به فاکتور افزایش طول G نیاز دارد. سپس tRNA مربوط به کدون دوم می‌تواند به محل A متصل شود، مرحله‌ای که به عوامل افزایش طول (در E.coli، با عنوان EF-Tu و EF-Ts نامیده می شوند) و همچنین گوانوزین تری فسفات (GTP) به عنوان منبع انرژی نیاز دارد.

سپس، پیوندهای پپتیدی بین اسیدهای آمینه اول و دوم مجاور هم اکنون از طریق فعالیت پپتیدیل ترانسفراز تشکیل می شود. برای سال‌ها تصور می‌شد که یک آنزیم این مرحله را کاتالیز می‌کند، اما شواهد اخیر نشان می‌دهد که فعالیت ترانسفراز یک تابع کاتالیزوری rRNA است. پس از تشکیل پیوند پپتیدی، ریبوزوم دوباره جابه جا می شود، در نتیجه باعث می شود tRNA محل E را اشغال کند. سپس tRNA به سیتوپلاسم رها می شود تا

اسید آمینه دیگری را بگیرد. علاوه بر این، سایت A اکنون خالی است و آماده دریافت tRNA برای کدون بعدی است. این فرآیند تا زمانی تکرار می شود که همه کدون های mRNA توسط مولکول های tRNA خوانده شوند و اسیدهای آمینه متصل به tRNA ها در زنجیره پلی پپتیدی در حال رشد به ترتیب مناسب به یکدیگر متصل شوند. در این مرحله، ترجمه باید خاتمه یابد و پروتئین نوپا باید از mRNA و ریبوزوم آزاد شود.

خاتمه ترجمه

سه کدون پایانی وجود دارد که در انتهای یک توالی کدکننده پروتئین در mRNA استفاده می‌شوند که عبارتند از UAA، UAG و UGA. هیچ tRNA ای این کدون ها را تشخیص نمی دهد. بنابراین، در جای این tRNA ها، یکی از چندین پروتئین، به نام فاکتورهای آزادسازی، متصل می شود و آزاد شدن mRNA از ریبوزوم و تجزیه بعدی ریبوزوم را تسهیل می کند.

مقایسه ترجمه یوکاریوتی و پروکاریوتی

فرآیند ترجمه در پروکاریوت ها و یوکاریوت ها بسیار شبیه است. اگرچه از فاکتورهای طویل، شروع و پایان متفاوت استفاده می شود، کد ژنتیکی عموما یکسان است. همانطور که قبلا ذکر شد، در باکتری ها، رونویسی و ترجمه به طور همزمان انجام می شود و mRNA ها نسبتا کوتاه مدت هستند. با این حال، در یوکاریوت ها، mRNA ها نیمه عمر بسیار متغیری دارند، در معرض تغییرات هستند و برای ترجمه باید از هسته خارج شوند. این مراحل چندگانه فرصت های بیشتری را برای تنظیم سطوح تولید پروتئین و در نتیجه تنظیم دقیق بیان ژن ارائه می دهد.